

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	林 昌平
審 査 委 員	<div>主 査 井藤 和人 ㊞</div> <div>副 査 横山 和平 ㊞</div> <div>副 査 巢山 弘介 ㊞</div> <div>副 査 荒瀬 榮 ㊞</div> <div>副 査 児玉 基一朗 ㊞</div>
題 目	河川生物膜における微生物の生態に関する研究 ー農薬の影響評価のためのモデル生物膜の構築と固体培地上での微生物間共生の機構解明ー
審査結果の要旨（2，000字以内） <p>本研究は、農薬の河川生物膜に及ぼす影響を群集レベルで再現性よく評価するために構築したモデル生物膜の有効性について検討し、さらに、その過程で発見されたシアノバクテリアと従属栄養細菌の固体培地上における共生の機構を解析したもので、その成果は以下の様に要約される。</p> <p>生物膜形成における農薬の影響を群集レベルで評価するために、一定の培養条件下でガラス基質上に、既知の微生物から構成されるモデル生物膜を構築した。微生物種を変えてモデル生物膜を形成させ、生物膜の細胞数、活性、群集構造を調査した結果、細菌 3 株 (<i>Pedobacter</i> sp. 7-11、<i>Aquaspirillum</i> sp. T-5、<i>Stenotrophomonas</i> sp. 3-7) と珪藻 2 株 (<i>Achnanthes minutissima</i> N71 と <i>Cyclotella meneghiniana</i> N803 または <i>Nitzschia palea</i> N489) の組み合わせにおいて、モデル生物膜の各生物学的指標はばらつきが小さく、生物膜の形成過程で各指標の値は安定的に増加した。また、細菌が存在しないと珪藻は付着せず、珪藻が存在しないと細菌は増殖しないことから、本モデル生物膜は、珪藻が細菌に光合成産物を供給し、細菌が珪藻に生物膜の形成に必要な付着環境を提供するという、珪藻と細菌の間の相互作用によって形成したことが示唆された。その後、本モデル生物膜を用いて除草剤アトラジンの毒性試験を行い、アトラジン濃度の対数値と生物膜形成過程における珪藻数、細菌数およびクロロフィル a 量の増加率に対する阻害割合との間に良好な負の相関関係が認められ、エステラーゼ活性を含めたそれらの測定項目でエンドポイントとして同様な EC<sub>50</sub> 値が暫定的に得られることを明らかにした。また、本モデル生物膜が微生物を単独で用いた毒性試験では検出できない農薬の間接的な影響を検出できること明らかにし</p>	

た。以上の結果から、本モデル生物膜が河川生物膜への農薬の影響を群集レベルで評価するために有効であることが示された。

本研究のモデル生物膜についての研究過程で、純粋培養したシアノバクテリア *Synechococcus leopoliensis* CCAP1405/1 が寒天培地上で増殖できないが別の従属栄養細菌が共存すると増殖できることを発見した。この微生物間の相互作用は分類学的に様々な系統の従属栄養細菌で認められ、その能力は培地組成やゲル化剤の種類によって影響を受けることを明らかにした。さらに、*S. leopoliensis* CCAP1405/1 を高密度で接種したり、ビタミン類、チオ硫酸を添加したりすることで *S. leopoliensis* CCAP1405/1 を寒天培地上で増殖させることが可能となったが、これまでに有効性が報告されているカタラーゼの添加は効果が認められず異なる増殖機構が示唆された。無機培地上では従属栄養細菌は *S. leopoliensis* CCAP1405/1 からの光合成産物を利用し、*S. leopoliensis* CCAP1405/1 の寒天培地上での増殖を支持したと考えられた。

一方、*S. leopoliensis* CCAP1405/1 を寒天培地上で増殖させる能力を持つ *Bacillus subtilis* 168 の遺伝子欠損株ライブラリーから *S. leopoliensis* CCAP1405/1 を増殖させる能力を失った増殖能欠失株を得て、それらの欠失遺伝子を同定したが、破壊された遺伝子間の関連性がなかったことから、この寒天培地上での相互作用には複雑で様々な因子が関与していることが示唆された。それらの中で、同化型亜硫酸還元酵素欠損株にシステインを添加すると *S. leopoliensis* CCAP1405/1 に対する増殖能が復帰したことから、*B. subtilis* 168 の同化型硫酸還元反応に続くシステイン生合成経路で生成されるシステインが *S. leopoliensis* CCAP1405/1 の増殖に関与していることが示唆された。

本研究は、河川生物膜に及ぼす農薬の影響評価のためのモデル生物膜を構築し、除草剤アトラジンの毒性試験を通してその有用性および生物膜の形成過程における珪藻と細菌の間の相互作用を明らかにした。また、河川生物膜に生息するシアノバクテリアを寒天培地上で増殖させることができる従属栄養細菌が系統的に広い範囲で存在することを示し、その機構がこれまでに報告されているものとは異なることを明らかにした。さらに、*B. subtilis* 168 の遺伝子欠損株ライブラリーを利用してその機構解明の手掛かりを提供した。これらの成果は、微生物生態学における河川生物膜など微生物群集に及ぼす農薬等化学物質の影響評価や微生物間相互作用の機構解明に寄与する新規な知見であり、博士（農学）の学位を与えるに十分な価値を持つものと判定した。